

QIASymphony SP protokollark

Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP

Generell informasjon

Til in vitro-diagnostisk bruk.

Disse protokollene er for rensing av total DNA fra vev og formalinfikserte, parafininnstøpte (FFPE) vev ved bruk av QIASymphony® SP og QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Protokoller for dyrkede celler og bakteriekulturer er under utvikling og vil være tilgjengelige snart.

Avhengig av prøvetypen anbefaler vi å bruke enten protokollen for lavt innhold (LC) eller høyt innhold (HC). Vev vil gi økte DNA-resultater når de behandles med protokollen for høyt innhold, men protokollen for lavt innhold, i kombinasjon med et lite elusjonsvolum (50 µl), kan brukes hvis det er nødvendig med høy DNA-konsentrasjon. For FFPE-vev anbefaler vi å bruke protokollen for lavt innhold.

Protokoll for lavt innhold

Sett	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236)
Prøvemateriale	FFPE-vev og vev* Opptil 4 FFPE-vevsnitt, hvert med en tykkelse på inntil 10 µm, eller 8 snitt, med en tykkelse på inntil 5 µm og et overflateområde på inntil 250 mm ² , kan kombineres i én klargjøring.
Protokollnavn	Tissue_LC_200_V7_DSP
Standard analysekontrollsett	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elusjonsvolum	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
Nødvendig programvareversjon	Versjon 4.0

* Se protokollen for høyt innhold for informasjon om vevsprøver.

April 2012



Sample & Assay Technologies

Protokoll for høyt innhold

Sett	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr. 937236)
Prøvemateriale	Vev Hvis det ikke er noen tilgjengelig informasjon om forventet resultat, anbefaler vi å starte med 25 mg prøvemateriale. Avhengig av oppnådd resultat kan prøvestørrelsen økes i etterfølgende klargjøringer.
Protokollnavn	Tissue_HC_200_V7_DSP
Standard analysekontrollsett	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elusjonsvolum	100 µl, 200 µl eller 400 µl
Nødvendig programvareversjon	Versjon 4.0

Nødvendige materialer som ikke er inkludert

For alle testtyper

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (kat.nr. 939016)
- Hvis RNA-fri DNA er påkrevet: DNase-fri RNase A (lagerløsning på 100 mg/ml)

For FFPE-vev (xylene-fri deparafinisering)

- Deparafineringsløsning (Deparaffinization Solution, kat.nr. 939018)

For FFPE-vev (deparafinisering ved bruk av xylene)

- Xylene (99-100 %)
- Etanol (96–100 %)*

* Ikke bruk denaturert alkohol, da denne inneholder ekstra stoffer, slik som metanol eller metyletylenketon.

“Sample”(Prøve)-skuffen

Prøvetype	FFPE-vev og vev
Prøveinnmatingsvolum	220 μ l (nødvendig per prøve, etter protokoll)*
Behandlet prøvevolum	200 μ l
Primære prøverør	n/a
Sekundære prøverør	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for mer informasjon.
Innlegg	Avhenger av type prøverør som brukes; for mer informasjon se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* På grunn av at prøveoverføringen av protokollene med høyt og lavt innholdufføres uten væsknivådeteksjon, vil ikke systemet gjenkjenne noe hvis prøvevolumet er mindre enn 220 μ l. Derfor må det sikres at prøveinngangsvolumet er 220 μ l.

n/a = ikke relevant.

“Reagents and Consumables” (Reagenser og forbruksvarer)-skuffen

Posisjon A1 og/eller A2	Reagenspatron
Posisjon B1	n/a
Spisstativholder 1–17	Engangsfilterspisser, 200 μ l eller 1500 μ l
Enhetsboksholder 1–4	Enhetsbokser inneholder prøveklargjøringspatroner eller 8-stangdeksler

n/a = ikke relevant.

“Waste” (Avfall)-skuffen

Enhetsboksholder 1-4	Tomme enhetsbokser
Avfallsposeholder	Avfallspose
Holder væskeavfallsflaske	for Tøm væskeavfallsflasken

“Eluate” (Eluat)-skuffen

Elusjonsstativ (vi anbefaler bruk av åpning 1, nedkjølingsposisjon) Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for mer informasjon.

Nødvendige plastdeler

	En omgang, 24 prøver*	To omganger, 48 prøver*	Tre omganger, 72 prøver*	Fire omganger, 96 prøver*
Filterspisser til engangsbruk, 200 μ l ^{†‡}	26	50	74	98
Filterspisser til engangsbruk, 1500 μ l ^{†‡}	72	136	200	264
Prøveklargjøringspatroner [§]	21	42	63	84
8-stangdeksler [¶]	3	6	9	12

* Bruk av mindre enn 24 prøver per omgang reduserer antall filterspisser til engangsbruk som kreves per kjøring.

[†] Det finnes 32 filterspisser/filterspisstativ.

[‡] Antall nødvendige filterspisser inkluderer filterspisser for 1 inventarskanning per reagenspatron.

[§] Det finnes 28 prøveklargjøringspatroner/enhetsboks.

[¶] Det finnes tolv 8-stangdeksler/enhetsboks.

Merk: Antall filterspisser som gis kan være forskjellig fra det antallet som vises i berøringsskjermen, avhengig av innstillingene. Vi anbefaler å laste maksimalt antall mulig spisser.

Elusjonsvolum

Elusjonsvolumet velges på berøringsskjermen. Avhengig av prøvetype og DNA-innhold kan endelig eluatvolum variere med inntil 15 μ l mindre enn valgt volum. På grunn av at eluatvolumet kan variere, anbefaler vi å kontrollere det faktiske eluatvolumet ved bruk av et automatisk analyseoppsettssystem som ikke verifiserer eluatvolumet forut for overføringen. Elusjon i lavere volum øker den endelige DNA-konsentrasjonen, men reduserer ytelsen noe. Vi anbefaler å bruke et elusjonsvolum som passer for den beregnede downstream-applikasjonen.

Klargjøring av prøvematerialer

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se gjeldende HMS-datablad (MSDS) som fås fra leverandøren av produktet.

Viktige poeng før du starter

- QIASymphonys magnetiske partikler renser både RNA og DNA hvis begge er til stede i prøven. Hvis RNA-fri DNA kreves, tilsett RNase A til prøven i det trinnet fsom indikeres i den respektive forhåndsbehandlingsprotokollen.

Ting du skal gjøre før du starter

- Kontroller Buffer ATL for hvitt presipitat. Ved behov inkuber i 30 minutter ved 37 °C med risting av og til for å løse opp presipitat.
- Still en termomikser eller blanderinkubator til den temperaturen som kreves for den respektive forhåndsbehandlingen.

Vev

Ferskt og frossent vev kan brukes til DNA-rensing. Resultat og DNA-kvalitet som oppnås, vil avhenge av vevstype, kilde og oppbevaringsforhold. Ferskt vev kan kuttes i små biter og oppbevares ved -20 °C eller -80 °C før behandling. Generelt sett anbefaler vi å bruke protokollen for høyt innhold, som vil gi økte DNA-resultater. Protokollen med lavt innhold, i kombinasjon med 50 µl elusjonsvolum, anbefales kun hvis høye DNA-konsentrasjoner er nødvendige for downstream-analyse. Hvis det ikke er noen tilgjengelig informasjon om forventet resultat, anbefaler vi å starte med 25 mg prøvemateriale ved bruk av protokollen med høyt innhold og 200 µl elusjonsvolum. Avhengig av oppnådd resultat kan prøvestørrelsen økes eller elusjonsvolumet kan reduseres i etterfølgende klargjøringer. Vær oppmerksom på at overlasting av klargjøringer i kombinasjon med små elusjonsvolumer kan forårsake overføring av magnetiske partikler til eluatet og forringe DNA-renheten og downstream-analysen.

Forhåndsbehandlingsprotokoll for vev

1. **Overfør vevsprøven til et 2 ml mikrosentrifugerør (medfølger ikke).**
2. **Tilsett 220 µl Buffer ATL.**
3. **Tilsett 20 µl proteinase K og bland ved å tappe på røret.**

Merk: Bruk proteinase K fra enzymstativet til QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

- 4. Plasser røret i en termomikser eller rister-inkubator og inkuber ved 56 °C med risting ved 900 o/min (eller inntil vevet er fullstendig lysert).**

Merk: Lyseringstiden varierer avhengig av vevstypen som behandles. For de fleste vev fullføres lyseringen innen 3 timer. Hvis lyseringen er ufullstendig etter 3 timer, slik som indikert gjennom tilstedeværelsen av uløselig materiale eller høyst viskøse lysater, kan lyseringstiden forlenges, eller uløselig materiale kan fjernes via sentrifugering, slik som beskrevet i trinn 6. Lysering over natten er mulig og påvirker ikke klargjøringen.

- 5. Hvis RNA-fritt genom-DNA er nødvendig, tilsett 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuber i 2 minutter ved romtemperatur (15–25 °C) før du fortsetter til trinn 6.**

- 6. Homogeniser prøven ved å pipettere opp og ned flere ganger.**

Merk: Hvis deler av uløselig materiale fortsatt finnes, sentrifuger ved 3000 x g i 1 minutt.

- 7. Overfør forsiktig 220 µl supernatant til prøverørene som er kompatible med prøveholderen til QIASymphony SP.**

For en fullstendig liste over kompatible prøverør se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler bruk av 2 ml rør (f.eks. Sarstedt, kat.nr. 72.693 eller 72.608).

FFPE-vev

Standard prosedyrer for formalinfiksering og parafininnstøpning fører alltid til betydelig fragmentering av nukleinsyrer. For å begrense omfanget av DNA-fragmentering sørg for å:

- Fiks vevsprøver i 4–10 % formalin så hurtig som mulig etter kirurgisk fjerning
- Bruk en fikseringstid på 14–24 timer (lengre fikseringstider fører til mer alvorlig DNA-fragmentering, noe som fører til dårlig ytelse i downstream-analyser)
- Dehydrer prøvene grundig før innstøpning (resterende formalin kan inhibere proteinase K-forbrenningen)

Startmaterialet for DNA-rensingen skal være ferskkuttede snitt av FFPE-vev. Opptil 4 snitt, hvert med en tykkelse på inntil 10 µm, eller 8 snitt, med en tykkelse på inntil 5 µm og et overflateområde på inntil 250 mm², kan behandles i én klargjøring. Hvis du ikke har noen informasjon om typen startmateriale, anbefaler vi å starte med ikke mer enn 3 snitt i en enkelt klargjøring. Avhengig av DNA-ytelse og renhet, kan det være mulig å bruke inntil 8 snitt i etterfølgende klargjøringer.

Forhåndsbehandlingsprotokoll for FFPE.vev

Deparafinisering ved bruk av deparafiniseringsløsning

- 1. Ved bruk av en skalpell trimmes overflødig parafin fra prøveblokken.**
- 2. Kutt opptil 4 snitt 10 µm tykke eller opptil 8 snitt 5 µm tykke.**

Merk: Hvis prøveoverflaten har blitt utsatt for luft, kast de første 2–3 snittene.
- 3. Plasser snittene umiddelbart i et 2 ml Sarstedt-rør (medfølger ikke, kat.nr. 72.693 eller 72.608) som er kompatibelt med prøveholderen til QIASymphony SP.**
- 4. Tilsett 200 µl Buffer ATL til snittene.**

5. Tilsett 20 µl proteinase K.

Merk: Bruk proteinase K fra enzymstativet til QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Tilsett 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (se tabellen nedenfor) og bland med vorteksblending.

Snittykkelse	Antall snitt	Volum på Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Plasser røret i en termomikser eller rister-inkubator og inkuber ved 56 °C i 1 time med risting ved 1000 o/min inntil vevet er fullstendig lysert.

Merk: Lyseringstiden varierer avhengig av vevstypen som behandles. For de fleste vev fullføres lyseringen innen 1 time. Hvis lyseringen er ufullstendig etter 1 time, slik som indikert gjennom tilstedeværelsen av uløselig materiale, kan lyseringstiden forlenges, eller uløselig materiale kan fjernes via sentrifugering, slik som beskrevet i trinn 10. Lysering over natten er mulig og påvirker ikke klargjøringen.

8. Inkuber ved 90 °C i 1 time.

Merk: Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvis formaldehydmodifisering av nukleinsyrer. Lengre inkubasjonstider eller høyere inkubasjonstemperaturer kan føre til mer fragmentert DNA. Hvis det brukes kun én varmeblokk, la prøven stå i romtemperatur etter 56 °C inkubasjon inntil varmeblokken har nådd 90 °C.

9. Hvis RNA-fritt genom-DNA er nødvendig, tilsett 2 µl RNase A (100 mg/ml) til nedre fase og inkuber i 2 minutter ved romtemperatur før du fortsetter til trinn 10. La prøven kjøles ned til romtemperatur før det tilsettes RNase A.

10. Sentrifuger ved full hastighet i 1 minutt ved romtemperatur.

11. Overfør forsiktig rør (som inneholder begge faser) til prøveholderen til QIASymphony SP.

Deparaffinering ved bruk av xylen

1. Ved bruk av en skalpell trimmes overflødig parafin fra prøveblokken.

2. Kutt opptil 4 snitt 10 µm tykke eller opptil 8 snitt 5 µm tykke.

Merk: Hvis prøveoverflaten har blitt utsatt for luft, kast de første 2–3 snittene.

3. **Umiddelbart skal snittene plasseres i et 1,5 eller 2 ml mikrosentrifugerør (medfølger ikke), og det tilsettes 1 ml xylen til prøven. Lukk lokket og utfør vorteks grundig i 10 sekunder.**
4. **Sentrifuger ved full hastighet i 2 minutt ved romtemperatur.**
5. **Fjern supernatanten ved å pipettere. Ikke fjern noe av pelleten.**
6. **Tilsett 1 ml etanol (96–100 %) til pelleten og bland ved å utføre vorteks**
Merk: Etanolen ekstraherer resterende xylen fra prøven.
7. **Sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ved romtemperatur.**
8. **Fjern supernatanten ved å pipettere. Ikke fjern noe av pelleten.**
Merk: Fjern forsiktig all resterende etanol ved bruk av en finpipetteringsspiss.
9. **Åpne røret og inkuber ved romtemperatur (15–25 °C) i 10 minutter eller inntil alt resterende etanol har fordampet.**
Merk: Inkubasjon kan utføres ved temperaturer på inntil 37 °C.
10. **Resuspender pelleten i 220 µl Buffer ATL.**
11. **Tilsett 20 µl proteinase K og bland ved å utføre vorteksblending.**
Merk: Bruk proteinase K fra enzymstativet til QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
12. **Inkuber ved 56 °C i 1 time (eller inntil prøven har blitt fullstendig lysert).**
Merk: Lyseringstiden varierer avhengig av vevstypen som behandles. For de fleste vev fullføres lyseringen innen 1 time. Hvis lyseringen er ufullstendig etter 1 time, slik som indikert gjennom tilstedeværelsen av uløselig materiale, kan lyseringstiden forlenges, eller uløselig materiale kan fjernes via sentrifugering, slik som beskrevet i trinn 16. Lysering over natten er mulig og påvirker ikke klargjøringen.
13. **Inkuber ved 90 °C i 1 time.**
Merk: Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvis formaldehydmodifisering av nukleinsyrer. Lengre inkubasjonstider eller høyere inkubasjonstemperaturer kan føre til mer fragmentert DNA. Hvis det brukes kun én varmeblokk, la prøven stå i romtemperatur etter 56 °C inkubasjon inntil varmeblokken har nådd 90 °C.
14. **Sentrifuger prøven kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.**
15. **Hvis RNA-fritt genom-DNA er nødvendig, tilsett 2 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuber i 2 minutter ved romtemperatur før du fortsetter til trinn 16. La prøven kjøles ned til romtemperatur før det tilsettes RNase A.**
16. **Overfør forsiktig 220 µl av lysatet til prøverørene som er kompatible med prøveholderen til QIASymphony SP.**
Merk: Hvis lysater inneholder materiale som ikke er forbrent, sentrifuger ved full hastighet i 2 minutter ved romtemperatur før du overfører supernatant til prøverørene. For en fullstendig liste over kompatible prøverør se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler bruk av 2 ml rør (f.eks. Sarstedt, kat.nr. 72.693 eller 72.608).

Merk: FFPE-vevsprotokollene er spesialutviklet til å kun rense lave mengder av RNA. Dette vil føre til en redusert fotometrisk målingsverdi sammenlignet med verdier som er oppnådd med det manuelle QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Dyrkede celler og bakterier

Forbehandlingsprotokoller for dyrkede celler, gram-negative og gram-positive bakterier vil være tilgjengelige snart.

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfrasingelser, se den respektive QIAGEN setthåndboken eller brukerhåndboken. QIAGEN-håndbøker kan forespørres fra QIAGENs tekniske service eller din lokale QIAGEN-distributør. Valgte håndbøker kan lastes ned fra www.qiagen.com/literature. HMS-datablad (MSDS) for alle QIAGEN-produkter kan lastes ned fra www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx.

Varemerker: QIAGEN®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Registrerte navn, varmerker osv. som brukes i dette dokumentet skal ikke betraktes som ubeskyttet av lov, selv om de ikke spesifikt er merket som dette.
© 2012 QIAGEN, alle rettigheter forbeholdt.

www.qiagen.com

Australia ■ 1-800-243-800

Austria ■ 0800/281010

Belgium ■ 0800-79612

Canada ■ 800-572-9613

China ■ 021-51345678

Denmark ■ 80-885945

Finland ■ 0800-914416

France ■ 01-60-920-930

Germany ■ 02103-29-12000

Hong Kong ■ 800 933 965

Ireland ■ 1800 555 049

Italy ■ 800 787980

Japan ■ 03-5547-0811

Korea (South) ■ 1544 7145

Luxembourg ■ 8002 2076

The Netherlands ■ 0800 0229592

Norway ■ 800-18859

Singapore ■ 65-67775366

Spain ■ 91-630-7050

Sweden ■ 020-790282

Switzerland ■ 055-254-22-11

UK ■ 01293-422-911

USA ■ 800-426-8157



Sample & Assay Technologies